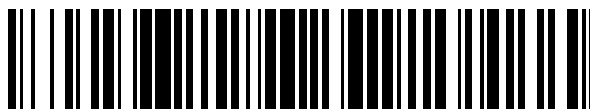


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 308**

51 Int. Cl.:

**B22F 1/00** (2006.01)  
**B22F 9/24** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2009.01)  
**A61K 33/26** (2006.01)  
**A61K 33/28** (2006.01)  
**A61K 33/30** (2006.01)  
**A61K 33/34** (2006.01)  
**B82Y 15/00** (2011.01)  
**B82Y 30/00** (2011.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2006** **PCT/ES2006/070121**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2007** **WO07017550**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006** **E 06778474 (4)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 1914196**

54 Título: **Clústeres cuánticos atómicos estables, su método de obtención y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**03.08.2005 ES 200502041**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**16.12.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
CITT - Edificio CACTUS, Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es:

**LOPEZ QUINTELA, MANUEL ARTURO y  
RIVAS REY, JOSÉ**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 799 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Clústeres cuánticos atómicos estables, su método de obtención y uso de los mismos

La presente invención se refiere a clústeres cuánticos de átomos (AQC) novedosos de elementos metálicos, caracterizados porque son estables en disolución líquida, durante horas, incluso días, sin la necesidad de un estabilizador externo, un procedimiento para su obtención mediante el control cinético de la reacción y los usos de dichos AQC como sensores (fluorescentes, magnéticos o químicos), electrocatalizadores y como citostáticos y/o citotóxicos.

#### Técnica anterior

Cuando los materiales se reducen a tamaños nano/subnanométricos muchas de las propiedades cambian drásticamente y aparecen otras nuevas, como consecuencia del paso macroscópico-mesoscópico-atómico. A modo de ejemplo, cuando el tamaño de materiales metálicos, como Ag y Au- se reduce a unos pocos átomos (< aproximadamente 200-500 átomos) aparece fluorescencia [Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson R. M. Phys. Rev.Lett. 2004, 93, 077402;], ferromagnetismo [Crespo, P.; Litran, R.; Rojas, T. C.; Multigner, M.; de la Fuente, J. M.; Sánchez- López, J. C.; García, M. A.; Hernando, A.; Penades, S.; Fernández, A. Phys. Rev. Lett. 2004, 93, 087204], quiralidad óptica [Schaaff, T. G.; Whetten, R. L. J. Phys. Chem. B 2000, 104, 2630], comportamiento de carga de tipo reducción-oxidación [Lee, D.; Donkers, R. L.; DeSimone, J. M.; Murray, R. W. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 1182], amplificación de la señal de Raman [Peyser-Capadona, L.; Zheng, J.; González, J.I.; Lee, T-H.; Patel, S. A.; Dickson, R. M. Phys. Rev. Lett, 2005, 94, 058301], etc.

Todas estas nuevas propiedades aparecen debido al confinamiento espacial de los electrones que origina la separación cuántica de los niveles de energía. De esta forma, estos materiales metálicos se comportan de manera muy diferente al material masivo. Este hecho de que reducir el material macroscópico produce cambios importantes en las propiedades de los materiales, es algo ya reconocido como una característica en la técnica en general. Así, a modo de ejemplo, materiales semiconductores, como el SCd, etc., presentan efectos cuánticos cuando su tamaño se reduce a unos pocos nanómetros, lo que se usa para sintonizar su fluorescencia a diferentes longitudes de onda y, por esta razón, se les denomina actualmente puntos cuánticos ("quantum dots"), que quiere indicar el hecho de que el confinamiento cuántico "cuasipuntual" que se origina en esas nanopartículas semiconductoras lleva a las mismas a tener propiedades diferentes según su tamaño. En el caso de los materiales metálicos, el cambio drástico en sus propiedades ocurre a tamaños inferiores (menores de unos pocos cientos de átomos), tamaños correspondientes a lo que se conoce como clústeres atómicos.

Debido a las potenciales aplicaciones de los clústeres cuánticos atómicos sobre todo en el campo de los biosensores [Peyser, L.A.; Vinson, A.E.; Bartko, A.P. ; Dickson, R.M., Science, 2001 , 297,103], electrocatálisis [Boyen H-G. *et al.* Science 2002, 297, 1533], etc., se ha despertado un gran interés por el desarrollo de métodos de síntesis sencillos que permitan obtenerlos en cantidades que pueden ampliarse a gran escala. Y es precisamente aquí donde reside el mayor problema para la aplicación de los AQC. Hasta el momento presente solamente se han podido obtener, bien por costosos procedimientos físicos en fase gaseosa [véase por ejemplo, E. G. de Jongh (ed), *Physics and Chemistry of Metal Cluster Compounds. Model Systems for Small Metal Particles, Series of Physical and Chemical Properties of Materials with Low-dimensional Structures*, Kluwer Academi, Dordrecht, 1994], bien por procedimientos eléctricos o electroquímicos pero en cantidades muy pequeñas de mezclas de clústeres de diferentes tamaños [Petty, J. T.; Zheng, J.; Hud, N.V.; Dickson, R. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 5207.]. En este último caso, los AQC deben purificarse luego mediante complejas técnicas de separación (HPLC, electroforesis en gel, etc.) [Jiménez, V. L.; Leopold, M. C.; Mazzitelli, C.; Jorgenson, J. W.; Murray, R. W. Anal. Chem. 2003, 75, 199], obteniéndose finalmente cantidades extremadamente pequeñas de los mismos, lo que hace muy difícil, tanto el estudio de sus propiedades como, y de manera más importante, su aplicación a gran escala. Debe destacarse que, en todos los casos, los clústeres obtenidos o bien estabilizados mediante moléculas protectoras, matrices sólidas o semisólidas, etc. o bien, su tiempo de vida es demasiado corto como para poder aislarse [Rodríguez-Sánchez, M.; Rodríguez, M.J. ; Blanco, M. C.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. J. Phys. Chem. B, 2005, 109, 1183, Zhang, Z; Patel, R.C.; Kothari, R; Johnson, C; Friberg, S.E. J. Phys. Chem. B 2000, 104, 1176-1182; patente US 6197720; Linnert T; Mulvaney, P; Henglein A; Weller, H. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4657-4664]. Se obtienen partículas de plata con un tamaño promedio de 7 nm en microemulsiones de agua en aceite reduciendo nitrato de plata con hipofosfito de sodio [Pavlyukhina, L.A.; Zaikova, T.O.; Odegova, G.V.; Savintseva, S.A.; Boldyrev, V.V. Inorganic Materials,1998, 34, 2, 109-113].

Hasta el momento, los métodos de preparación de clústeres/nanopartículas se basan en la teoría de nucleación-crecimiento, estos tratan de obtener un número muy elevado de núcleos en un tiempo muy corto ("explosión de núcleos"), para lo cual se procura acelerar al máximo la velocidad de la reacción [Sugimoto, T Monodisperse Particles (Eisevier, Nueva York, 2001 )]. Esto es, por ejemplo, lo que se hace en el bien conocido método de Brust [Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. J. Chem. Soc, Chem. Commun. 1994, 801] para generar nanopartículas monodispersas de oro.

La teoría de nucleación-crecimiento es una teoría termodinámica clásica que se basa en el hecho de que la formación de una nueva fase (sólida en este caso) dentro de un líquido (la disolución de partida con los reactivos) siempre

conlleva la aparición de una interfase y, por lo tanto, se requiere una energía interfacial adicional (denominada energía de Laplace), dada por el producto de la tensión interfacial del sólido que se forma por el área interfacial formada. Esta energía hace que las partículas que posean un tamaño inferior a uno crítico no sean estables y se redisuelvan en el medio de reacción. De acuerdo con esta teoría, solamente las partículas con un tamaño superior al crítico son capaces de crear y formar las partículas sólidas obtenidas finalmente.

Aunque no se descarta que esa forma de razonamiento termodinámico sea válida en determinadas circunstancias, fundamentalmente para la preparación de partículas metálicas de tamaños mayores de 1 -5 nm, sin embargo, ese enfoque no es adecuado para la preparación de AQC o clústeres atómicos, puesto que en este caso no tiene sentido hablar de conceptos termodinámicos clásicos como: presión de Laplace, núcleo crítico, etc., no teniendo por ello sentido hablar de redisolución de clústeres con tamaños menores a uno crítico.

Desde el punto de vista teórico, se ha predicho desde hace tiempo que la estabilidad de los clústeres atómicos vendría determinada por otros factores, de los cuales el efecto de capas electrónicas y/o atómicas juega un papel fundamental [(a)Kreibig, U.; Vollmer, M. *Optical Properties of Metal Clusters* (Springer-Verlag, Berlín, 1995); (b) Lee, H. M.; Ge, M.; Sahu, B.R.; Tarakeshwar, P.; Kim, K. S. *J.Phys.Chem. B* 2003, 707, 9994]. Así, para átomos aislados, de acuerdo con el modelo "jellium" [Metal Clusters, editado por W. Ekardt (Wiley, Nueva York,1999)], los clústeres de 2, 8, 18, ... átomos serían los más estables por poseer capas electrónicas completas. Por su parte, teniendo en cuenta la simetría atómica, clústeres aislados con simetría m-Dh [Barnett, R. N.; Cleveland, C. L.; Häkkinen, H.; Luedke, W. D.; Yannouleas, C.; Landman, U. *Eur. Phys. J. D* 1999, 9, 95] presentarían una mayor estabilidad para 38, 75, 101, 146,... átomos; mientras que clústeres aislados con simetría fcc [Schmid, G. *Chem. Rev.* 1992, 92, 1709], presentarían mayor estabilidad para 13, 55, 147, 309, 561, ... átomos. Estas predicciones han podido confirmarse tan solo en clústeres de vida muy corta obtenidos en fase gaseosa. La presencia de moléculas, especies químicas, cavidades y matrices sólidas puede introducir una estabilidad adicional, tal como se ha observado en diferentes casos particulares [véase por ejemplo, Fojtik, A.; Henglein, A.; Jana, E. *J. Phys. Chem.* 1992, 96, 8203].

Es conveniente indicar que, aunque existen algunos procedimientos específicos para obtener clústeres de un determinado tamaño y para algún metal determinado, como por ejemplo, los referenciados en la patente WO2004/003558 para obtener clústeres de Au, Ag, Cu o metales del grupo platino formados por 227 átomos de metal, o los descritos por G. Schmid [G. Schmid, *Adv. Eng. Mat.* 2001, 3, 737] para la preparación de  $\text{Au}_{55}(\text{PPh}_3)_{12}\text{Cl}_6$  sin embargo, dichos clústeres solo son estables en presencia de agentes estabilizadores.

El documento US 2005/064618 A 1 da a conocer nanocables que comprenden clústeres, el documento Rabin, I. *et al.*, *Chemical Physics Letters*, 2000, 59-64 da a conocer clústeres de  $\text{Ag}_3$ . El documento de Belloni, J. *et al.*, *New Journal of Chemistry*, 1998, 22, n.º 11, 1239-1255 informe sobre clústeres de plata.

### Explicación de la invención

El procedimiento objeto de la presente invención tiene como finalidad la obtención de forma fácil y cuantitativa de AQC (clústeres cuánticos atómicos de elementos metálicos), estables, funcionalizados y de tamaños controlados, de modo que es fácil y posible el escalado para la producción industrial de este tipo de nano/subnanomateriales.

De aquí en adelante, se denominará a las partículas nano/subnanométricas formadas por elementos metálicos,  $\text{M}_n$ , en donde M representa cualquier metal, con n menor (<) de 500 átomos, es decir con un tamaño menor de 2 nm, como clústeres cuánticos atómicos y se representarán por el acrónimo AQC (atomic quantum clusters).

Hay que destacar que, aunque la presente patente de invención se refiere únicamente a materiales formados por elementos denominados comúnmente metales, sin embargo muchos de los mismos, debido al confinamiento cuántico a que se ha aludido y la consiguiente separación de los niveles energéticos, pueden no tener un carácter metálico sino semiconductor o aislante, dependiendo de su tamaño y de los ligandos a los que se están unidos directamente los AQC.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan clústeres cuánticos atómicos (AQC) estables, caracterizados porque consisten en entre más de 2 y menos de 27 átomos de metal (entre aproximadamente 0,4 nm y 0,9 nm de tamaño) y aún más preferiblemente AQC formados por entre 2 y 5 átomos de metal y más particularmente de 2 o 3 átomos (que corresponden a un tamaño de entre 0,4 y 0,5 nm), caracterizados además porque son estables en disolución líquida durante horas, incluso días, sin un estabilizador externo, que puede obtenerse por el procedimiento de la invención.

En la presente invención, se entiende por AQC estables aquellas agrupaciones de átomos que conservan en el tiempo el número de átomos y, por lo tanto, sus propiedades, de forma tal que pueden aislarse y manipularse como cualquier compuesto químico.

Estos AQC se conservan durante horas, incluso días, sin un estabilizador externo.

En una realización preferida, los metales de los que están formados esos AQC se seleccionan de entre Au, Ag, Co, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh, Pb o sus combinaciones bi- y multimetálicas. Preferiblemente, los metales de los AQC se seleccionan de Au y Ag o sus combinaciones bimetalicas, debido a las fascinantes propiedades presentadas por algunos clústeres específicos de estos metales, entre las que se pueden citar: catálisis, propiedades citostáticas, etc. a las cuales se hará referencia posteriormente.

El procedimiento de la presente invención consiste en la reducción de la sal o ion metálico (o sales o iones metálicos), y esta caracterizado porque tiene un control cinético mediante lo cual se obtiene lentamente la reducción de la sal o ion metálico (sales o iones metálicos), manteniendo simultáneamente una pequeña constante de velocidad y una baja concentración de reactivos.

En la presente invención, se entiende por baja concentración y pequeña constante de velocidad aquellos valores que conducen al sistema a través del mínimo de energía potencial de la correspondiente coordenada de reacción. A efectos prácticos, se entiende por concentraciones bajas, concentraciones del ion metálico y/o reductor inferiores a una concentración de  $10^{-3}$  M; y por constantes de velocidad pequeñas a aquellas correspondientes a tiempos de vida de semirreacción mayores de 1 segundo.

Por tanto, el procedimiento consiste, como mínimo, en las siguientes etapas:

a. un control cinético para la reducción lenta, en el que se usan reductores suaves seleccionados del grupo que consiste en hipofosfato de sodio, aminas, azúcares, tioles, ácidos orgánicos, polímeros, radiación UV-VIS, ultrasonidos y corriente eléctrica para obtener el control cinético, y

b. mantener una concentración de reactivos de menos de  $10^{-3}$ M en el medio de reacción.

Hasta la actualidad, los métodos de preparación de clústeres/nanopartículas se han basado en la teoría de nucleación-crecimiento. Según esta teoría, es necesario que la reacción de producción de nanopartículas/clústeres sea muy rápida al objeto de lograr una gran cantidad de núcleos. Una vez se ha producido la nucleación, todos los núcleos crecen al unísono y de esa forma se logra obtener nanopartículas de tamaños muy monodispersos.

Aunque la teoría termodinámica de nucleación-crecimiento ha tenido un gran éxito para explicar la preparación de partículas monodispersas de tamaños micro y submicrométrico, sin embargo, se plantea la pregunta de hasta qué punto la formación de un clúster cuántico atómico de 3 o 4 átomos por reacción química en disolución (por ejemplo, por reducción de una sal del ion metálico correspondiente que va a reducirse) puede considerarse como una nueva fase. De hecho, la formación de un clúster metálico de unos pocos átomos por reacción química en disolución es más similar a los innumerables ejemplos que existen de formación de complejos químicos inorgánicos/organometálicos (o también a la formación de polímeros) a partir de sus reactivos y, sin embargo, en todos esos casos el complejo inorgánico (o el polímero, siempre que su peso molecular no sea demasiado elevado) no se asocia con la formación de una nueva fase termodinámica, sino con la formación de un nuevo compuesto químico "molecular" al que, por lo tanto, puede asociarse una energía superficial de Laplace. En ese caso, la formación del nuevo compuesto está determinada por la cinética del propio proceso de producción. Y esta es precisamente la base en la que se fundamenta el procedimiento propuesto en la presente invención: la utilización del control cinético para la obtención de AQC (clústeres cuánticos atómicos) de tamaño controlado.

La figura 1 muestra un esquema representativo de la variación de energía libre que se pone en juego a lo largo de una reacción de formación de metal en disolución, a partir de sus iones metálicos. Los reactivos representan un ion metálico cualquiera en presencia de un reductor (o de un cátodo donde tiene lugar la reducción del ion metálico correspondiente). La reacción comienza con la formación de un AQC de 1 átomo ( $M_1$ ), luego de dos ( $M_2$ ), etc. hasta que finalmente se obtienen partículas sólidas del material metálico reducido (P). La figura representa el hecho de que a medida que el AQC aumenta y se aproxima al tamaño de una partícula, P, (se considera partícula cuando el número de átomos del clúster atómico es elevado, del orden de n mayor de aproximadamente 500 átomos ( $n > \text{aproximadamente } 500 \text{ átomos}$ ), es decir, mayor de aproximadamente 2 nm, de modo que sus propiedades son diferentes de las de los clústeres de tamaño menor), de modo que, las diferencias de energía entre los diferentes AQC son menores. Debe destacarse que el esquema es muy general y no indica el hecho generalmente encontrado en la práctica de que los valles de potencial pueden ser diferentes (por ejemplo, menores para un clúster más pequeño que otro más grande), así como también que las energías de activación pueden variar de unos clústeres a otros. Además, pueden existir otras rutas de reacción en donde un clúster con n átomos,  $M_n$ , puede asociarse a otro con m átomos,  $M_m$ , para dar uno mayor con n+m átomos,  $M_{n+m}$ . También hay que destacar que las diferencias de energía entre valles pueden ser suficientemente pequeñas como para que existan equilibrios entre algunos de los clústeres.

Por tanto, la presente invención se basa en la idea de que la cinética juega un papel decisivo en la formación de los AQC (clústeres cuánticos atómicos) y que, controlando (ralentizando) convenientemente esa cinética puede controlarse la formación de AQC específicos.

La formación de clústeres no está limitada ni al tipo de elemento metálico sintetizado ni al propio método electroquímico, por lo que cualquier otro método químico de reducción de sales metálicas en disolución puede ser

utilizado para la obtención de estos clústeres atómicos, siempre y cuando la reacción se ralentice suficientemente, tal como se especificará posteriormente, como para observar la evolución de los AQC y detener la reacción (por ejemplo, por enfriamiento, dilución y/o fijación/separación de los clústeres del medio de reacción) en el momento que sea de interés un AQC de un tamaño determinado. Precisamente por este hecho, la utilización de sistemas

- 5 bifásicos/bicomponentes (agua/compuesto orgánico) o bifásicos/tricomponentes (como microemulsiones formadas por agua, compuesto orgánico y un detergente), en los que es posible disponer de una concentración muy pequeña de reactivos en el agua/compuesto orgánico son especialmente apropiados para la preparación de clústeres en cantidades macroscópicas adecuadas o el escalado de la producción a nivel industrial.
- 10 Esto puede entenderse de forma cualitativa suponiendo que una reacción es como si se deslizase una rueda por la curva de energía potencial representada en la figura 1. Cuando se utiliza una reacción rápida, la energía comunicada a dicha rueda es tan grande que supera los máximos que hay entre los diferentes valles y acaba cayendo a los valles más profundos (es decir, transformándose rápidamente en partículas P de gran tamaño, mayores que 2-5 nm). Por el contrario, la presente invención, basada en ralentizar la reacción implica comunicar una energía muy pequeña a la
- 15 rueda. Esta, por lo tanto, caerá inicialmente en el primer mínimo (clúster  $M_1$ ) y solo después de un tiempo apreciable irá cayendo sucesivamente en los siguientes mínimos correspondientes a AQC mayores. Ese tiempo/tiempos que tarda el AQC en caer en los diferentes mínimos puede optimizarse para dar tiempo a separar los AQC obtenidos (por ejemplo, por precipitación) o bien para estabilizar los mismos introduciendo un agente químico o molécula estabilizadora en el medio de reacción.

- 20 Conviene indicar que la introducción inicial en el medio de reacción de agentes estabilizadores puede hacer variar el mínimo del valle de potencial de alguno(s) AQC. Su introducción inicial puede llevarse a cabo para favorecer un determinado tipo de AQC y también para disponer de un mayor tiempo para la manipulación del AQC antes de su estabilización y funcionalización definitiva. En cualquier caso, su introducción no es esencial para el método propuesto en el presente documento y que se continúa describiendo a continuación.

Como se ha destacado anteriormente, es importante en el procedimiento de la presente invención 1) ralentizar la reacción y 2) mantener una concentración baja de reactivos.

- 30 Por tanto, en la presente invención, para ralentizar la reacción se usa un reductor suave, que se selecciona de entre el grupo que comprende hipofosfito sódico, aminas, azúcares, ácidos orgánicos, polímeros (tales como la polivinilpirrolidona), radiación UV-VIS, ultrasonidos o corriente eléctrica.

- 35 Para el segundo punto de mantener concentraciones bajas de reactivos, pueden usarse dos formas según las cuales el medio de reacción es mono o bifásico.

En el caso de utilizar un medio monofásico, la forma preferible de proceder, es generar el ion metálico "*in situ*" en concentraciones muy bajas mediante la disolución anódica (preferiblemente una corriente constante) de un electrodo del metal correspondiente.

- 40 La segunda opción es utilizar un sistema bifásico (agua/compuesto orgánico) en el que la sal metálica se disuelve en el agua y se elige un reductor que solamente se disuelva en el compuesto orgánico (por ejemplo, pero sin limitarse a, una amina, un tiol o un ácido, de hidrocarburo de cadena larga), de tal modo que la reacción solo ocurre en la interfase y, por lo tanto, con una concentración local efectiva de reactivos muy pequeña.

- 45 En una realización preferida de la presente invención, se utilizan como compuestos orgánicos, entre otros, hidrocarburos saturados e insaturados, cíclicos, lineales o ramificados, tales como por ejemplo, pero sin limitarse a, hexano, heptano, isooctano, ciclohexano; así como también benceno o tolueno.

- 50 En el caso de los sistemas bifásicos, con el fin de aumentar el rendimiento de la reacción, se puede aumentar la interfase agua-compuesto orgánico, utilizando para ello microemulsiones formadas por agua, compuesto orgánico y un detergente que permiten al mismo tiempo mantener la concentración local de reactivos muy baja dentro de las nanogotas que forman la micro emulsión. En este caso, como detergente es posible usar tanto detergentes aniónicos, tales como sulfonatos alifáticos o aromáticos, por ejemplo, los derivados de ácidos sulfocarboxílicos; detergentes
- 55 catiónicos como, por ejemplo, bromuros o acetatos de alquilamonios; o detergentes no iónicos como, por ejemplo, derivados de polioxietileno.

- Al hacer la reacción lenta, siguiendo cualquiera de los procedimientos descritos, puede seguirse la evolución de los clústeres y, una vez que se logra el clúster del tamaño deseado, es posible proteger/estabilizar en el medio de reacción
- 60 añadiéndole un agente estabilizador, que consiste en una molécula que contenga grupos orgánicos (tales como tioles, sulfuros, aminas, ácidos, tioéteres, fosfinas o aminoácidos, etc.) de acuerdo con el metal del que se quiera obtener el clúster.

- La separación del clúster del medio de reacción puede hacerse por precipitación, disminuyendo la temperatura y/o
- 65 añadiendo un disolvente incompatible con el clúster haciendo uso de las diferentes propiedades de solubilidad de los

AQC según su tamaño, así como también mediante fijación, haciendo uso de su diferente afinidad por dichos grupos estabilizadores.

Para aplicaciones posteriores, podría obtenerse el AQC funcionalizado. En ese caso, el agente estabilizador ha de ser una molécula que debe poseer, al menos, dos extremos con grupos químicos diferentes: un extremo con uno de los grupos mencionados anteriormente para unirse al AQC y otro con cualquier otro grupo orgánico (de entre los que podemos citar: dobles y triples enlaces, grupos alcohólicos, grupos ácidos o grupos amina) para su interacción con o unión posterior a otras moléculas o átomos para aplicaciones específicas

Por tanto, por ejemplo, pueden prepararse AQC funcionalizados añadiendo dodecanotiol disuelto en pentano observándose la transferencia de los clústeres de la fase de acetonitrilo a la fase de pentano. La introducción de un tiol o tioéter soluble en agua, como, por ejemplo, glutatona, tioglicol, tioacético, etc. permite también su funcionalización y transferencia al agua, siendo posible usar luego una reacción adicional para unir los AQC funcionalizados de ese modo a cualquier otra molécula, ion o sustrato para las aplicaciones finales requeridas de los AQC.

Con objeto de identificar los AQC para su separación y aislamiento pueden utilizarse, además de las diferentes propiedades de solubilidad y afinidad por los grupos estabilizadores que presentan los AQC según su tamaño, como se acaba de mencionar, también las diferentes propiedades ópticas, fluorescentes, vibracionales, redox, eléctricas y magnéticas que poseen estos clústeres. En efecto, se ha observado que estos AQC presentan propiedades fluorescentes. El intervalo de fluorescencia varía entre ultravioleta (para los clústeres más pequeños, de 2-3 átomos), visible (para los clústeres entre 4-10 átomos) e infrarrojo cercano (para clústeres por encima de 10 átomos). Se ha observado también que las bandas de fluorescencia son muy estrechas, tal como muestra la figura 17. Asimismo, se han observado propiedades magnéticas en estos clústeres. La figura 18 muestra un ejemplo de dichas propiedades. Estas propiedades pueden usarse para la construcción de sensores y biosensores fluorescentes y magnéticos.

Otro aspecto de la presente invención da a conocer el uso de los AQC mencionados anteriormente, como agentes químicos reductores. Por tanto, se ha observado que los clústeres de Au son capaces de reducir el azul de metileno provocando la desaparición de la banda característica de la forma oxidada (655 nm).

Otro aspecto de la presente invención da a conocer el uso de los AQC mencionados anteriormente, como electrocatalizadores.

Estos clústeres son muy estables electroquímicamente de modo que el intervalo de potenciales de trabajo con dispersiones de estos clústeres está limitado por los valores de los potenciales de reducción y oxidación del medio en el que están dispersos. Por tanto, por ejemplo, se ha verificado la estabilidad de los clústeres de Ag en TBAAC en el intervalo (-3.V a +1,8V). Su alta estabilidad electroquímica los hace apropiados para aplicaciones en diversos tipos de reacciones de electrocatálisis.

En una realización preferida, los AQC presentan su actividad electrocatalítica en reacciones de reducción, que comprende entre otras, la reducción del oxígeno y/o peróxido de hidrógeno.

Se han sintetizado dispersiones estables de clústeres de Ag, Au, Pt, Cu que poseen propiedades catalíticas. Dichas propiedades surgen como consecuencia del enorme poder reductor que poseen los clústeres metálicos de unos pocos átomos  $M_n$  ( $n < 50-100$ ).

La gran afinidad electrónica de los clústeres produce fuertes interacciones con los electrones de otros átomos incluso de los más electronegativos como, por ejemplo, los halógenos o el oxígeno, debilitando los enlaces covalentes que forman estos átomos en moléculas estables. Por tanto, por ejemplo, los clústeres de plata y oro son capaces de absorber gas de oxígeno contribuyendo a la disociación de las moléculas y, en consecuencia, reduciendo la energía necesaria para su electrorreducción. En el ejemplo 3 se comprueba ampliamente este hecho.

En otra realización preferida, los AQC tienen su actividad electrocatalítica en reacciones de oxidación alcohólica.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de los AQC mencionados anteriormente para la elaboración de fármacos anticancerígenos por sus propiedades citostáticas y citotóxicas.

Estas propiedades de los AQC se demuestran en el presente documento particularmente mediante ensayos *in vitro* realizados con células de cáncer de mama.

En la presente invención todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o etapas. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención se inferirán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

### Figura 1

La figura 1 muestra un esquema representativo de la variación de energía libre que se pone en juego a lo largo de la reacción de formación de metales en disolución, a partir de sus iones metálicos. Los reactivos representan un ion metálico cualquiera en presencia de un reductor (o de un cátodo donde tiene lugar la reducción del ion metálico correspondiente).  $M_1$  se refiere a un AQC de 1 átomo,  $M_2$  de dos átomos, etc. y  $p$  se refiere a las partículas sólidas del material metálico reducido.

### Figura 2

La figura 2 muestra el espectro característico de los AQC de Au producidos por precipitación y estabilizados con dodecanotiol.

### Figura 3

La figura 3 muestra una microscopía de transmisión electrónica de agrupaciones de los AQC de Au sintetizados. Hay que destacar que los tamaños observados por microscopía (muy polidispersos y mayores que aproximadamente 1-2 nm) no corresponden realmente a partículas de Au sino a agrupaciones de AQC.

### Figura 4

La figura 4 muestra las mediciones realizadas por electroespectrometría por tiempo de vuelo 30 veces.

### Figura 5

La figura 5 muestra el espectro UV-VIS de los AQC de mayor tamaño, tanto de los inicialmente dispersos en el líquido de reacción, como de los producidos por precipitación, protegidos por dodecanotiol, y redispersos nuevamente en cloroformo.

### Figura 6

La figura 6 muestra una fotografía de microscopía electrónica de la mezcla de AQC de  $Au_{12}$  y  $Au_{21}$ , que se forman por unión de 4 y 7 clústeres de  $Au_3$ .

### Figura 7

La figura 7 muestra el espectro de IS UV-VIS de AQC de Ag sintetizados según el ejemplo 2.

### Figura 8

La figura 8 muestra una fotografía de microscopía electrónica de los AQC de Ag sintetizados según el ejemplo 2.

### Figura 9

Esta figura muestra el espectro UV-VIS de AQC de Ag transcurridos 5 días después de la síntesis.

### Figura 10

Esta figura muestra el espectro UV-VIS de AQC de Ag transcurridos 13 días después de la síntesis.

### Figura 11

Esta figura muestra una fotografía de microscopía electrónica de la muestra de AQC de Ag transcurridos 13 días después de la síntesis.

### Figura 12

Voltametrías cíclicas ( $E_{inicial} = +1V$ ) de TBAAc 0,1 M, saturadas con  $O_2$ . Electrodo de trabajo: Pt policristalino, a 25 °C, velocidad de barrido 20 mV/s. (a) en ausencia, (b) en presencia de clústeres dispersos en el electrolito soporte.

### Figura 13

Voltametrías lineales en disoluciones acuosas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ácido perclórico 0,5 M. Electrodo de trabajo: carbono vítreo (a) en ausencia, (b) en presencia de clústeres depositados sobre carbono vítreo. Como comparación se muestra una voltametría de carbono vítreo en ácido perclórico 0,5 M.

5 Figura 14

Voltametrías cíclicas ( $E_{\text{inicial}} = +0,1 \text{ V}$ ) en una disolución acuosa de MeOH 1 M y NaOH 1 M. Electrodo de trabajo: Pt policristalino sin y con clústeres de Ag depositados.  $T=25^\circ\text{C}$ , velocidad de barrido 20 mV/s. Como referencia se muestra también la respuesta de Pt en NaOH (línea continua)

10

Línea de triángulos: MeOH/NaOH (Pt modificado)

Línea de círculos: MeOH/NaOH (Pt sin modificar)

15 Línea continua: NaOH (Pt sin modificar)

Figura 15

20 Esta figura (NP 0,1 y NP 0,2) muestra la absorbancia (proporcional a la concentración de células) en función de la concentración de clústeres de Ag añadidos. Como referencia se muestra la absorbancia correspondiente a las células sin tratamiento. Los resultados se comparan con el efecto del disolvente puro y la puromicina. Las diferentes barras muestran los resultados obtenidos a diferente número de horas (0, 24 y 48 horas).

Figura 16

25 Esta figura (NP 45 y NP 46) muestra la absorbancia (proporcional a la concentración de células) según la concentración de clústeres de Au añadidos. Como referencia se muestra la absorbancia correspondiente a las células sin tratamiento. Los 15 resultados se comparan con el efecto del disolvente puro y la puromicina. Las diferentes barras muestran los resultados obtenidos a diferente número de horas (0, 24 y 48 horas).

30

Figura 17

Espectro de fluorescencia de clústeres de  $\text{Ag}_n$  (con  $n = 2,3$ ) para diferentes 20 longitudes de excitación.

35 Figura 18

Espectro de EPR (resonancia paramagnética electrónica) muestra la resonancia paramagnética con estructura hiperfina en clústeres de  $\text{Ag}_n$  con  $n=5$ , a dos temperaturas diferentes.

#### 40 Explicación detallada de realizaciones

A continuación se ilustrará la invención mediante ensayos realizados por los inventores.

Ejemplo 1

45

Síntesis de AQC de Au

La síntesis de AQC de Au se llevó a cabo en una celda electroquímica, usando una potenciometría galvanostática, aplicando una densidad de corriente constante de  $10 \text{ mA/cm}^2$  durante 1000 s, en las siguientes condiciones experimentales:

50

- Electrodo de trabajo: Pt ( $2,5 \text{ cm}^2$ )

- Contraelectrodo: Au (el metal del que están formados los AQC)

55

- Electrodo de referencia: Ag/AgCl

- Disolución electrolítica y agente estabilizador: 0,1 M en bromuro de tetrabutilamonio en acetonitrilo.

60

- Temperatura:  $25^\circ\text{C}$

- Atmósfera de nitrógeno inerte

65 Tras la síntesis, los AQC producidos inicialmente de color marrón (AQC de 1 -2 átomos, tal como se verá más adelante), se transfirieron a un Erlenmeyer, observándose que después de 2 horas adquirirían un color amarillo,



apareciendo un precipitado depositado en el fondo. La precipitación de los AQC ocurrió debido a la solubilidad limitada de los mismos en el medio de reacción.

Estos AQC, predominantemente de 3 átomos, separados por precipitación son mucho más estables que los de 1-2 átomos, (al menos en las condiciones experimentales utilizadas), ya que aún sin protección adicional permanecieron estables durante 5 meses a temperatura ambiente.

Una vez producidos, los clústeres pueden funcionalizarse. Así por ejemplo, se prepararon AQC funcionalizados añadiendo dodecanotiol disuelto en pentano, observándose la transferencia de los clústeres de la fase de acetonitrilo (que se volvió transparente) a la fase de pentano (que se volvió amarilla).

La figura 2 muestra el espectro característico de los AQC de Au producidos por precipitación y estabilizados con dodecanotiol.

La figura 3 se muestra una microscopía de transmisión electrónica de agrupaciones de los AQC de Au sintetizados. Hay que destacar que los tamaños observados en la microscopía (muy polidispersos y mayores que aproximadamente 1 -2 nm) no corresponden realmente a partículas de Au sino a agrupaciones de AQC. El pequeño tamaño de los mismos hace que no sea posible su observación directa por microscopía electrónica y únicamente puede observarse su presencia por la aparición de una nube negruzca como fondo de la rejilla de microscopio, junto con la formación de agrupaciones (clústeres) de estos AQC de tamaños muy diferentes, que se observan como zonas más negras en la rejilla. El hecho de que las zonas más oscuras no corresponden a partículas, se corrobora también por la ausencia de la banda plasmónica que debería ser visible en el caso de que no se tratara de agrupaciones de AQC sino de partículas de tamaños nanométricos. Por su parte, mediciones realizadas por espectrometría de masas por tiempo de vuelo (figura 4) permitieron determinar claramente que los clústeres producidos de este modo estaban formados predominantemente por clústeres de 3 átomos con la fórmula estequiométrica  $\text{Au}_3(\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{S})_3$  como se demuestra por la presencia del pico de masa mayor más importante situado a 1200 uma. Se observa en este caso que el clúster de  $\text{Au}_3$  está protegido perfectamente con el dodecanotiol utilizado, en el que el dodecanotiol ha perdido los hidrógenos del grupo SH al unirse directamente al clúster de  $\text{Au}_3$ .

El hecho de que este clúster sea un  $\text{Au}_3$  indica que los clústeres producidos inicialmente (de color marrón), precursores del presente AQC de 3 átomos, están formados por 2 átomos. Se observa que, aún sin proteger, esos clústeres de 2 átomos ( $\text{Au}_2$ ) son estables en el medio de reacción durante aproximadamente 2 horas. Ese tiempo sería suficiente para su precipitación, aislamiento y posterior protección y/o funcionalización.

Los AQC de  $\text{Au}_3$  sin proteger (en ausencia de tiol) eran estables en esas condiciones durante varios meses. Después de 5 meses, se observó la evolución de esos AQC hacia la formación de otros AQC de mayor tamaño, fácilmente observable por el cambio de color de amarillo a rojo a simple vista. Esos nuevos AQC de mayor tamaño precipitaron (por su menor solubilidad, ya que esta disminuye a medida que aumenta el tamaño de AQC, debido a la reducción de entropía de la mezcla). La precipitación puede también favorecerse haciendo disminuir la temperatura. Así, por ejemplo, se observó la formación de un precipitado rojo apreciable a partir de una alícuota de la disolución de los AQC al ponerla a 0°C.

La figura 5 muestra el espectro UV-VIS de estos últimos AQC de mayor tamaño, tanto de los inicialmente dispersos en el líquido de reacción, como de los producidos por precipitación, protegidos por dodecanotiol, y redispersos nuevamente en cloroformo. Las nuevas bandas que aparecen a 410 nm y 520 nm son indicativas de la existencia de mezclas de AQC de  $\text{Au}_{12}$  y  $\text{Au}_{21}$ , que se forman por unión de 4 y 7 clústeres de  $\text{Au}_3$ , respectivamente. La figura 6 muestra una microscopía electrónica de estos AQC. De nuevo, debido al pequeño tamaño de los mismos, solo se observa un fondo negro, así como en algunas partes manchas más oscuras de diferentes tamaños provenientes de la formación de agrupaciones más densas de estos AQC.

Debe indicarse, finalmente, que los valores de los parámetros experimentales indicados en este ejemplo, tales como la densidad de corriente, el tipo de cátodo usado, la temperatura, el tipo y la concentración de electrolito de fondo, son solamente indicativos, a modo de ejemplo. Otros valores de densidad de corriente, elementos utilizados para el cátodo, temperaturas y tipos y concentraciones del electrolito de fondo, así como agente protector, pueden también usarse para el mismo propósito siempre que se mantenga una concentración suficientemente pequeña de iones metálicos en el medio de reacción como para que la reacción transcurra por el mínimo de energía potencial.

## Ejemplo 2

### Síntesis de AQC de Ag.

La síntesis de AQC de Ag se realizó utilizando microemulsiones de agua/AOT/isooctano (AOT= aerosol OT = bis 2 etil-hexil sulfosuccinato de sodio) en las siguientes condiciones experimentales:

- Relación  $W_o = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 6$

- Disolución de AOT en isooctano: 0,1 M

- Disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$ : 0,1 M

5 - Disolución acuosa de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 1 M

- Temperatura: 25°C

10 La síntesis se llevó a cabo mezclando dos microemulsiones, una con el reductor y otra con la sal de plata. La microemulsión de sal de plata se preparó por adición de 0,54 ml de la disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  a la de AOT en isooctano, mientras que la del reductor se obtuvo añadiendo 0,54 ml de la disolución acuosa del reductor hipofosfito sódico a la de AOT en isooctano.

15 En condiciones de agitación se llevó a cabo la adición de la microemulsión de  $\text{AgNO}_3$  a la microemulsión reductora manteniendo el goteo constante durante 50 minutos. Al finalizar dicha adición, la mezcla presentaba un color amarillo que adquiere mayor intensidad con el paso de tiempo llegando a ser negruzco por aumento de la concentración de los AQC, como puede deducirse porque al diluir la muestra presenta nuevamente color amarillo oro. La figura 7 muestra el espectro de IS UV-VIS de los AQC de Ag sintetizados. La presencia de una única banda situada alrededor de los 220 nm indica que el tamaño de estos clústeres es de 2 átomos. La figura 8 muestra una fotografía de microscopía electrónica de los AQC de Ag. De nuevo ocurre igual que con los AQC de Au: solo se observa una mancha grisácea a la que se superponen algunas agrupaciones de dichos AQC. Los AQC producidos de ese modo evolucionaron al cabo de varias horas con la formación de un nuevo clúster de 4 átomos asociado a la presencia de una banda situada alrededor de los 260 nm.

25 Estos clústeres de  $\text{Ag}_4$ , sin protección adicional, eran estables a temperatura ambiente, al menos durante 5 días (la estabilización se debe, en este caso, a la presencia del surfactante AOT), después de los cuales evoluciona a la formación de un clúster de  $\text{Ag}_{12}$  como se observa por la aparición de una nueva banda situada alrededor de los 400 nm, tal como se muestra en la figura 9. A su vez, estos nuevos clústeres de  $\text{Ag}_{12}$ , sin protección adicional, permanecen estables durante 12-13 días a temperatura ambiente. Después de ese tiempo, los clústeres de  $\text{Ag}_{12}$  evolucionaron a la formación de AQC mayores, lo que se observa por el cambio de color a grisáceo, que se corresponde con la disminución de la banda a 400 nm y la aparición de una banda más ancha a longitudes mayores, tal como se muestra en la figura 10. La figura 11 muestra una fotografía de estos últimos AQC que, como puede observarse, continúan siendo mucho más pequeños que 1 nm, por lo que solamente se observan como una mancha gris sobre la rejilla en la que fueron depositados. Al igual que ocurría con los AQC de Au, si no se estabilizaban y/o se separaban (por ejemplo, por precipitación) los AQC seguían creciendo, alcanzando sucesivamente tamaños mayores. Finalmente, se alcanzó el tamaño de nanopartículas, clústeres mayores de aproximadamente 500 átomos, observándose finalmente la aparición de la banda plasmónica que indica la desaparición de los efectos cuánticos de tamaño y la formación de partículas de tamaños superiores a aproximadamente 1 - 2 nm.

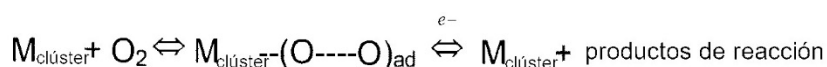
40 Debe indicarse finalmente que en este ejemplo tanto los parámetros experimentales utilizados, como el tipo de anfililo, la relación de concentraciones  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{detergente}] = W_o$ , el volumen de la fase dispersa, el disolvente orgánico utilizado, la temperatura y concentración de los reactivos, son solamente indicativos a modo de ejemplo. Asimismo, tal como se comentó en la descripción del método de invención, este método no está restringido únicamente a clústeres monometálicos, produciéndose también clústeres multimetálicos siguiendo el mismo procedimiento. Así, en el presente ejemplo, sustituyendo en el medio de reacción inicial la disolución acuosa de Ag por una mezcla de sales de Ag y Au y/o Cu y/o Co y/o Pt y/o Fe y/o Cr y/o Pd y/o Ni y/o Rh y/o Pb, se producen clústeres formados por combinaciones bi o multimetálicas dependiendo del número y concentración de los iones metálicos utilizados.

### Ejemplo 3

50 Actividad electrocatalítica de clústeres metálicos en reducción de oxígeno.

Se comprobó la actividad electrocatalítica de clústeres metálicos comparando la respuesta voltamétrica en la reducción de oxígeno.

55 El siguiente esquema ilustra la actividad electrocatalítica de clústeres metálicos en la reducción del oxígeno:



60 Esta reacción se llevó a cabo en disoluciones de acetonitrilo, utilizando un microelectrodo de Pt policristalino (diámetro = 0,5 mm) como electrodo de trabajo, un contraelectrodo de Pt y un alambre de Ag como pseudoreferencia ( $E = 0,13$  V frente a NHE).

La figura 12 muestra el comportamiento en voltametría cíclica de la electroreducción de  $O_2$  a concentración de saturación, en acetato de tetrabutilamonio (TBAAC) 0,1 M; en ausencia curva (a) y en presencia curva (b), de clústeres de plata,  $Ag_n$  ( $n=3, 4$ ).

- 5 Se comprobó, tal y como se observa en la figura 12, que, en presencia de clústeres, se produce un fuerte aumento de la corriente alrededor de - 0,7 V, lo que significa que los clústeres de Ag utilizados son catalizadores más efectivos que el Pt, que es el catalizador más activo que se conoce en la reducción de oxígeno.

#### Ejemplo 4

- 10 Actividad electrocatalítica de clústeres metálicos en reducción de peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ .

Se ha comprobado el efecto electrocatalítico de clústeres de Ag en la reducción de  $H_2O_2$  tomando mediciones en disoluciones libres de  $O_2$  que contienen  $H_2O_2$  como única especie susceptible de reducción. La figura 13 muestra voltametrías lineales de barrido en disolución acuosa que contiene  $H_2O_2$  0,024 M y  $ClO_4H$  0,5 M. Para las mediciones se usó como electrodo de trabajo carbono vítreo (curva a) y carbono vítreo modificado con clústeres de plata,  $Ag_n$  ( $n=3,4$ ) (curva b). Como contraelectrodo se utilizó alambre de Pt. Los potenciales están referidos a un electrodo de Ag/ClAg (saturado). En dicha figura se observa, a partir de - 0,15 V, un aumento de la corriente de reducción de  $H_2O_2$  en la curva b (presencia de clústeres de Ag) con respecto a la curva a (ausencia de clústeres); en la ampliación se puede apreciar que dicho aumento es alrededor del 7 % para  $E = -0,45$  V.

Se comprobó que estos clústeres presentan una actividad catalítica mayor que la de nanopartículas de Ag.

#### Ejemplo 5

- 25 Actividad electrocatalítica de clústeres metálicos en oxidación de alcohol.

Se comprobó la actividad electrocatalítica de clústeres metálicos en oxidación de alcohol, y más concretamente el uso de clústeres de Ag en oxidación de metanol. Dicha oxidación se produce en el intervalo de 0 V a +1 V. Para comprobar dicho efecto, los clústeres de Ag, dispersos en acetonitrilo, se depositaron sobre Pt policristalino. Después de comprobar su estabilidad en el medio electrolítico, es decir, la ausencia de picos redox, (hasta  $E=+1,2$  V) de los clústeres así depositados, se transfirió el electrodo modificado a una disolución acuosa de metanol 1 M que contiene 0,1 M de NaOH. Los resultados pueden observarse en la figura 14, en donde se observan tres picos de oxidación (A, B, C) en el barrido anódico, que corresponden a la oxidación del metanol sobre clústeres de diferente tamaño. Se observó también el aumento final de la corriente de oxidación debida a la presencia de los clústeres depositados sobre Pt (Pt modificado).

Se comprueba así que los clústeres son catalizadores más efectivos en la oxidación de alcoholes que el Pt.

#### Ejemplo 6

Ensayos de toxicidad mediante MTT.

- 45 Se evaluó la toxicidad de clústeres de Au y Ag sobre cultivos de las líneas MCF7, de cáncer de mama, que se realizaron mediante estudios de viabilidad celular con la sal de metil-tiazol-tetrazolio (MTT).

Se sembraron  $4 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen total de 100  $\mu$ l/pocillo. Se estabilizaron las células durante 24 horas, se retiró el medio inicial y se substituyó por 100  $\mu$ l de medio con los tratamientos ensayados. Tras el tiempo de exposición, que varió entre 24 y 48 horas, se realizó el ensayo MTT.

Se añadieron 10  $\mu$ l de sustrato MTT y después de 4 horas de incubación se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de la solución de lisis: 10 % de SDS en HCl 10 mM. Tras lisar las células durante toda la noche se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas modelo 550 (Bio-Rad).

#### Resultados:

6a) La figura 15 muestra los resultados al añadir disoluciones de clústeres de Ag preparados electroquímicamente según el primer ejemplo y dispersos en agua (muestras NP 0,1 y NP 0,2 correspondientes a clústeres de 2-5 átomos y 6-15 átomos, respectivamente). Se pueden observar claramente los efectos citostáticos de los clústeres para concentraciones superiores a 1  $\mu$ M. Estos efectos son comparables a los de un citostático utilizado habitualmente como es la Puromicina. Se observa además que el efecto citostático es diferente según el tipo de clústeres, ya que la muestra NP 0,2 es más efectiva, aunque en este caso se observa una cierta citotoxicidad, como se puede ver por la disminución del número de células iniciales (disminución de la absorbancia inicial).

6b) La figura 16 muestra los resultados al añadir disoluciones de clústeres de Au preparados electroquímicamente según el primer ejemplo (muestras NP 45 y NP 46, correspondientes a clústeres de 2-5 átomos y 6- 15 átomos,

- 5      respectivamente). Se pueden observar claramente los efectos citostáticos de los clústeres para concentraciones superiores a 10 nM (muestra NP45) y 100 nM (muestra NP46). Estos efectos son comparables a los de un citostático utilizado habitualmente como la Puromicina. Se observa además que el efecto citostático es diferente según el tipo de clústeres, ya que la muestra NP46 es más efectiva, su citotoxicidad es también mucho mayor, como se puede ver debido a la gran disminución del número de células iniciales (disminución de la absorbancia inicial).

## REIVINDICACIONES

1. Clústeres cuánticos atómicos estables, AQC, que consisten en entre 2 y menos de 27 átomos metálicos, caracterizados porque son estables en disolución líquida durante horas, incluso días, sin un estabilizador externo,  
obtenibles por reducción de la sal o ion metálico, o sales o iones metálicos, en los que dicha reducción está caracterizada porque:
  - a. tiene un control cinético para una reducción, en el que se usan reductores suaves seleccionados del grupo que consiste en hipofosfato de sodio, aminas, azúcares, tioles, ácidos orgánicos, polímeros, radiación UV-VIS, ultrasonidos y corriente eléctrica para producir el control cinético, y
  - b. mantiene una concentración de reactivos de menos de  $10^{-3}M$  en el medio de reacción.
2. AQC según la reivindicación 1, caracterizados porque consisten en entre 2 y 5 átomos metálicos.
3. AQC según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el metal se selecciona de la lista que comprende Au, Ag, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh, Pb o cualquiera de sus combinaciones bi o multimetálicas.
4. AQC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el metal es Au, Ag o cualquiera de sus combinaciones bimetalicas.
5. Procedimiento para la obtención de los AQC de las reivindicaciones 1 a 4, por reducción de la sal o ion metálico, o sales o iones metálicos, caracterizado porque:
  - a. tiene un control cinético para una reducción, en el que se usan reductores suaves seleccionados del grupo que consiste en hipofosfato de sodio, aminas, azúcares, tioles, ácidos orgánicos, polímeros, radiación UV-VIS, ultrasonidos y corriente eléctrica para producir el control cinético, y
  - b. mantiene una concentración de reactivos de menos de  $10^{-3} M$  en el medio de reacción.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el reductor suave es corriente eléctrica.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde para mantener la concentración de reactivos el medio de reacción comprende medios monofásicos o bifásicos.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde los sistemas bifásicos están formados por agua, en la que se disuelve la sal metálica, y un compuesto orgánico, en el que se disuelve el reductor.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, donde los compuestos orgánicos se seleccionan del grupo que comprende hidrocarburos saturados e insaturados, cíclicos, lineales o ramificados, así como benceno o tolueno.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 8 o 9, que comprende un detergente además de agua y un compuesto orgánico.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, donde el detergente se elige de un grupo que comprende detergentes aniónicos, catiónicos o no iónicos.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, que incluye la separación de los AQC sintetizados mediante su precipitación selectiva, una vez alcanzado el tamaño de clúster deseado.
13. Procedimiento según las reivindicaciones 5 a 12, donde se añaden agentes estabilizadores al medio de reacción.
14. Procedimiento según las reivindicación 13, donde los agentes estabilizadores se eligen de entre las moléculas que tienen grupos que pueden unirse con los AQC.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, donde los agentes estabilizadores, se eligen de entre el grupo que comprende tioles, sulfuros, aminas, ácidos tioéteres, fosfinas o aminoácidos.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, donde los agentes estabilizadores tienen, al menos, dos extremos con grupos químicos diferentes: uno para unirse con los AQC y otro con un grupo funcional orgánico.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde el grupo funcional orgánico se elige del grupo que

comprende alcoholes, ácidos, aminas, alquenos o alquinos.

18. Uso de los AQC según las reivindicaciones 1 a 4, como sensores y biosensores fluorescentes.
- 5 19. Uso de los AQC según las reivindicaciones 1 a 4, como sensores y biosensores magnéticos.
20. Uso de los AQC según las reivindicaciones 1 a 4, como agentes redox.
21. Uso de los AQC según las reivindicaciones 1 a 4, como electrocatalizadores.
- 10 22. Uso según la reivindicación 20, donde los AQC actúan como catalizador en una reacción de reducción.
23. Uso según la reivindicación 22, donde los AQC actúan como catalizador en la reducción del oxígeno o peróxido de hidrógeno.
- 15 24. Uso según la reivindicación 20, donde los AQC actúan como catalizador en una reacción de oxidación.
25. Uso según la reivindicación 24, donde los AQC actúan como catalizador en la oxidación de alcohol.
- 20 26. AQC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como citostáticos o citotóxicos.
27. Uso de los AQC según las reivindicaciones 1 a 4, en la elaboración de un fármaco para el tratamiento de cáncer.
- 25 28. AQC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de cáncer.

FIGURA 1

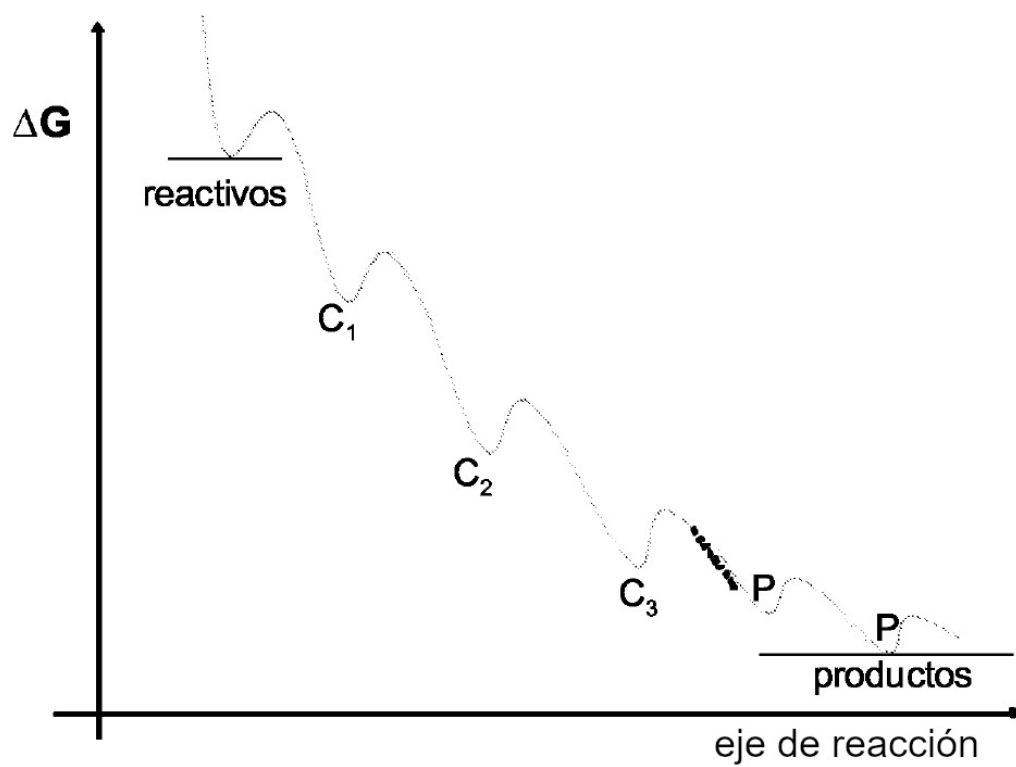


FIGURA 2

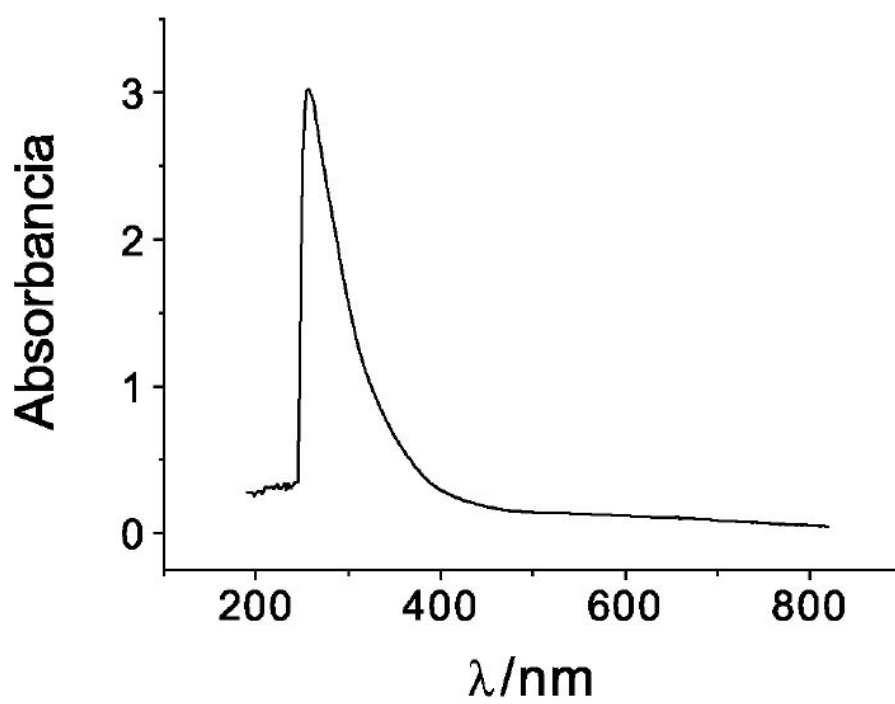


FIG 3

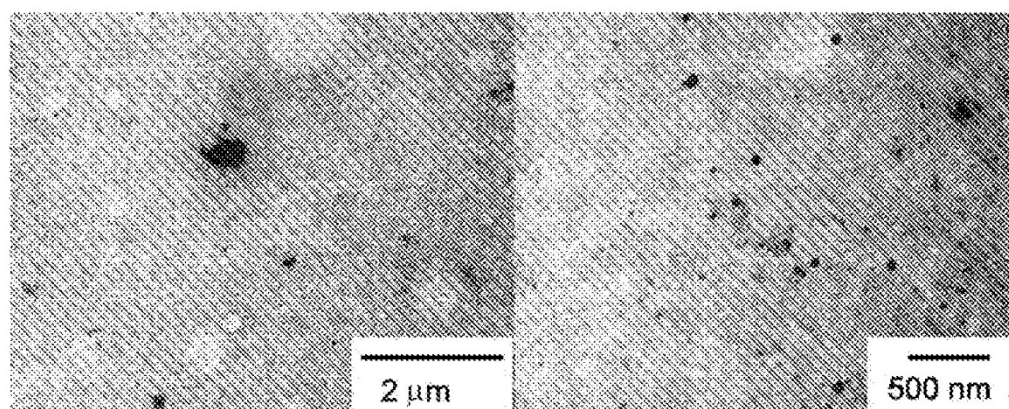


FIG 4

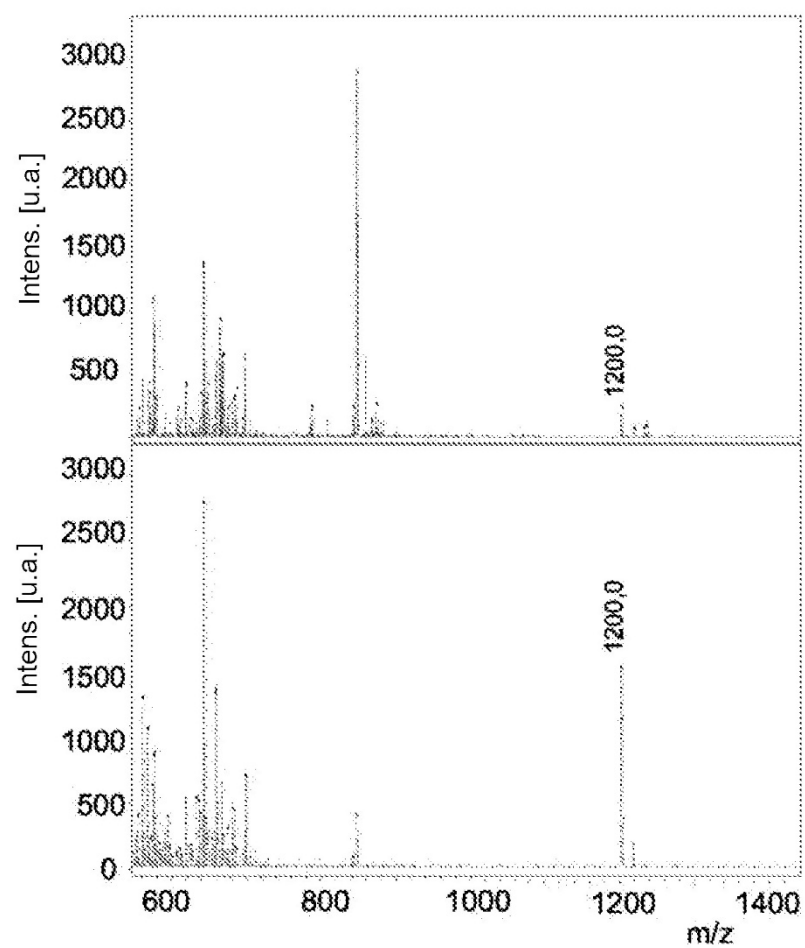




FIGURA 5

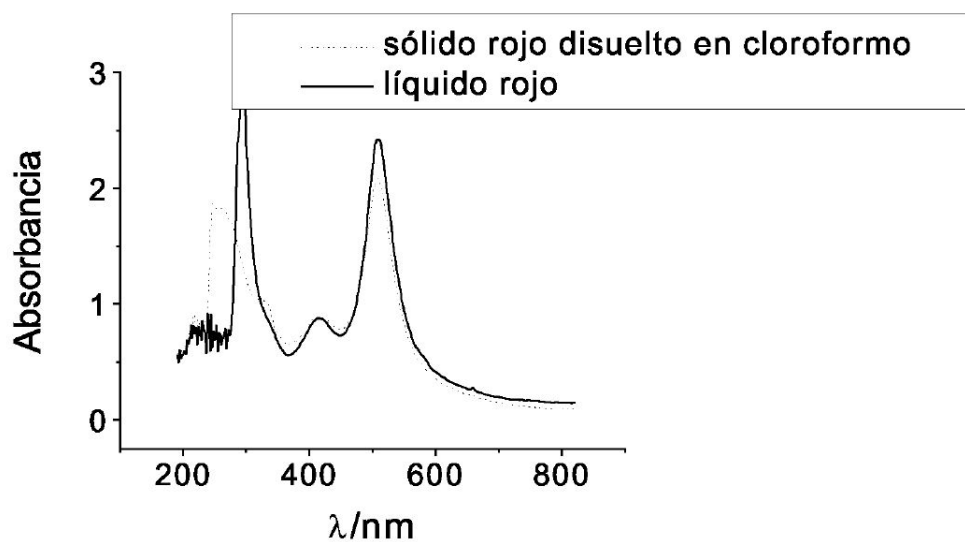


FIGURA 6

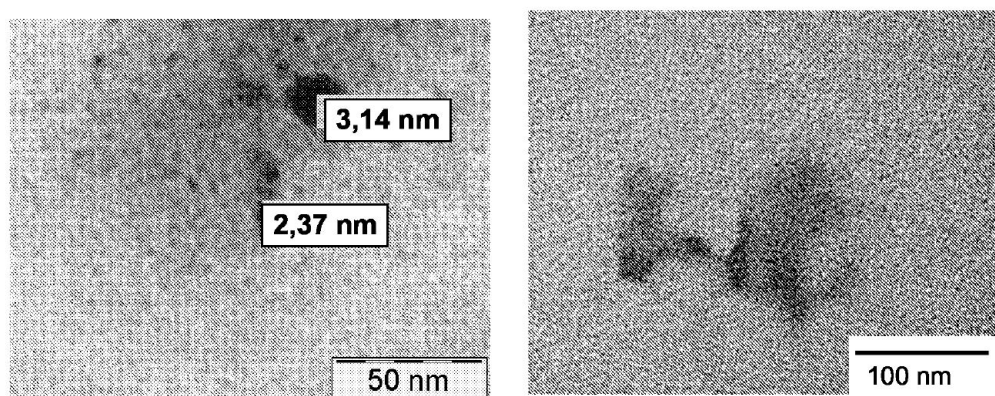


FIGURA 7

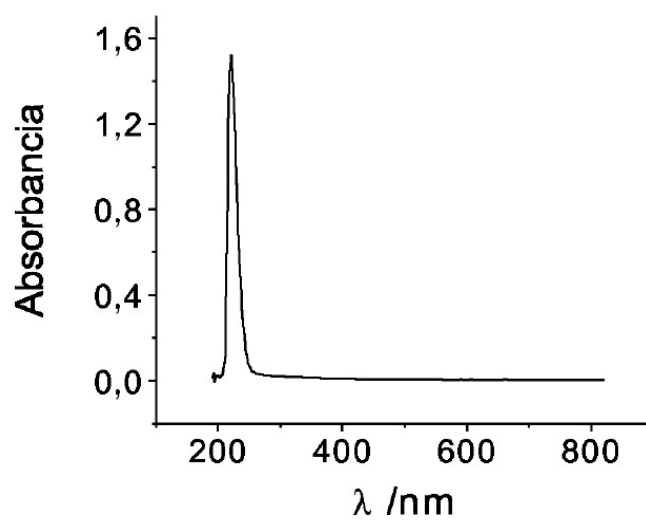


FIG 8

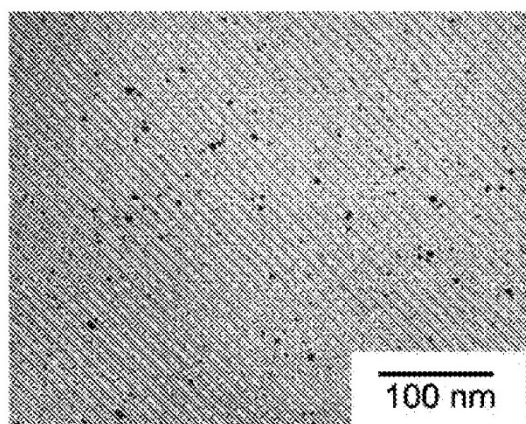


FIG 9

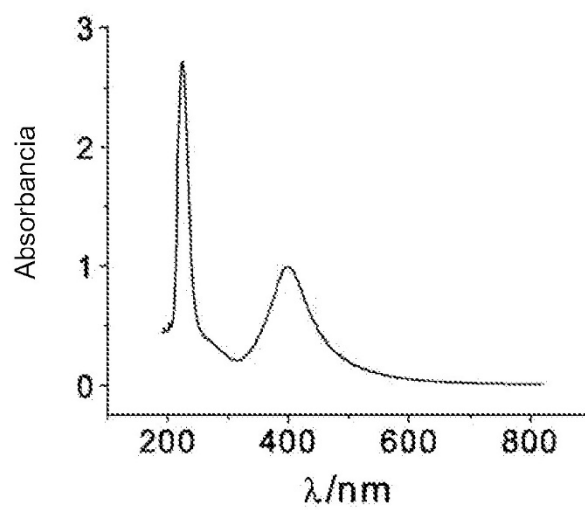


FIGURA 10

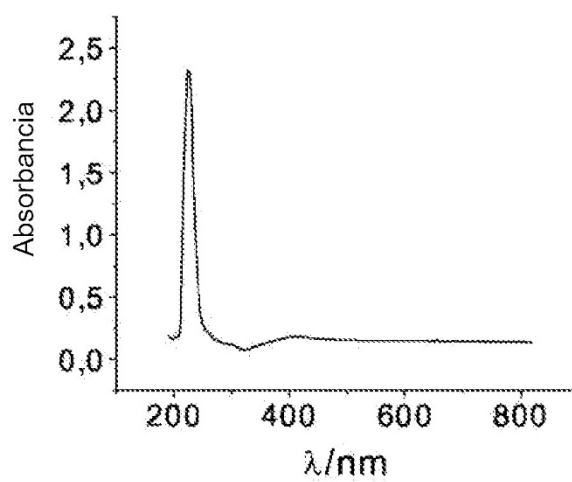


FIG 11

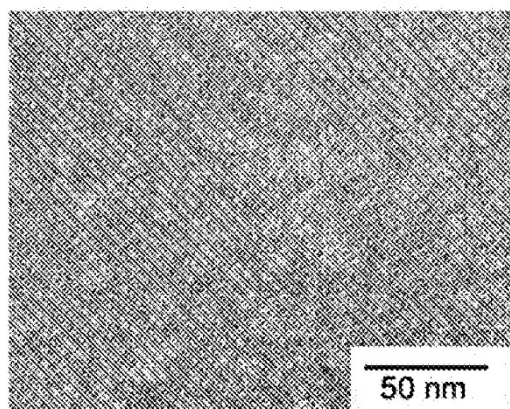


FIG 12

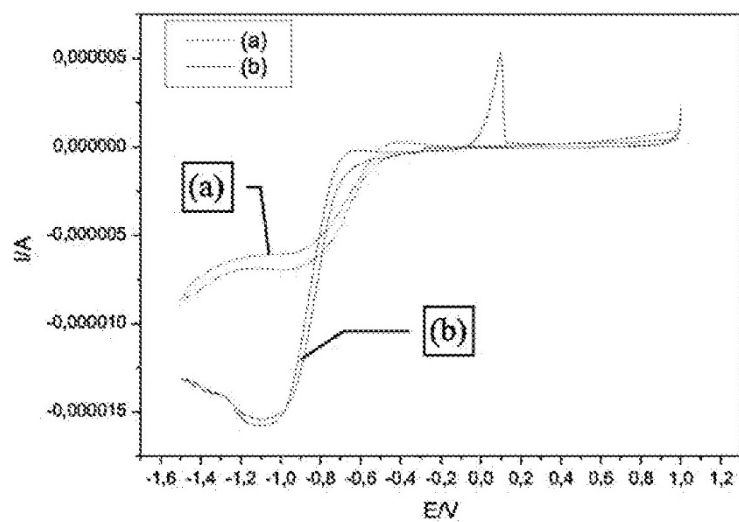
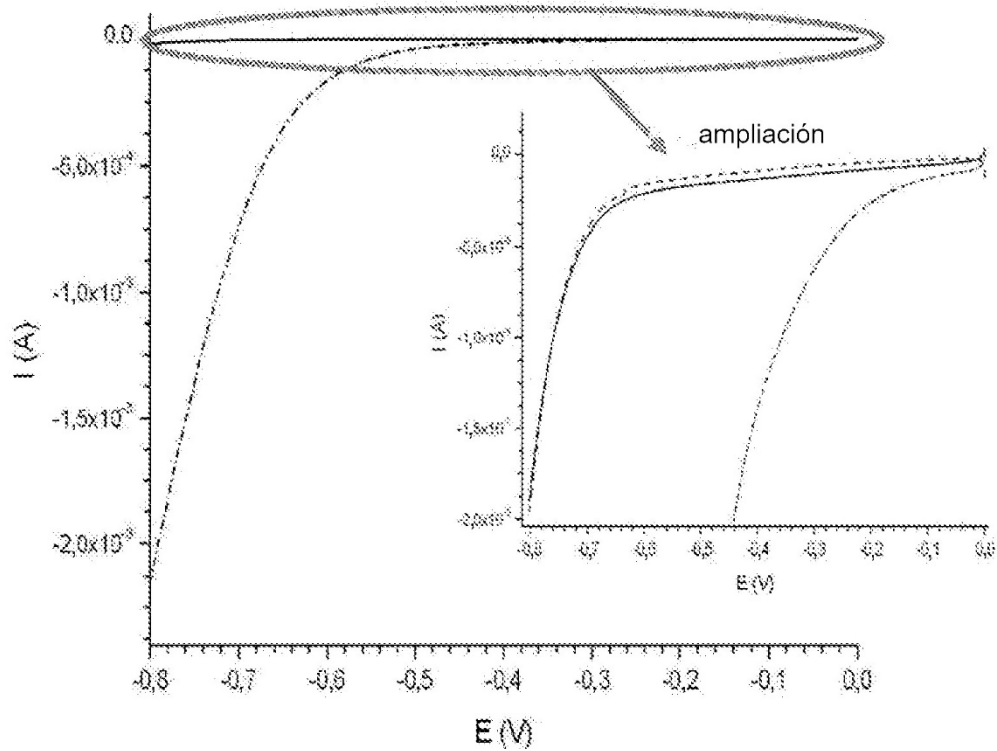


FIG 13



Todos los ensayos realizados en atmósfera de nitrógeno

———— Electrodo de carbono vítreo

----- Electrodo de carbono vítreo - in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Curva A

- . - . - . Electrodo de carbono vítreo modificado - en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Curva B

FIG 14

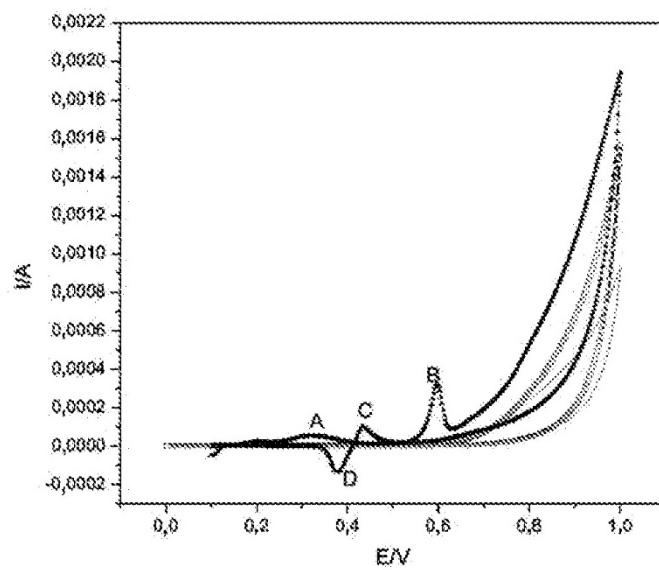


FIG 15

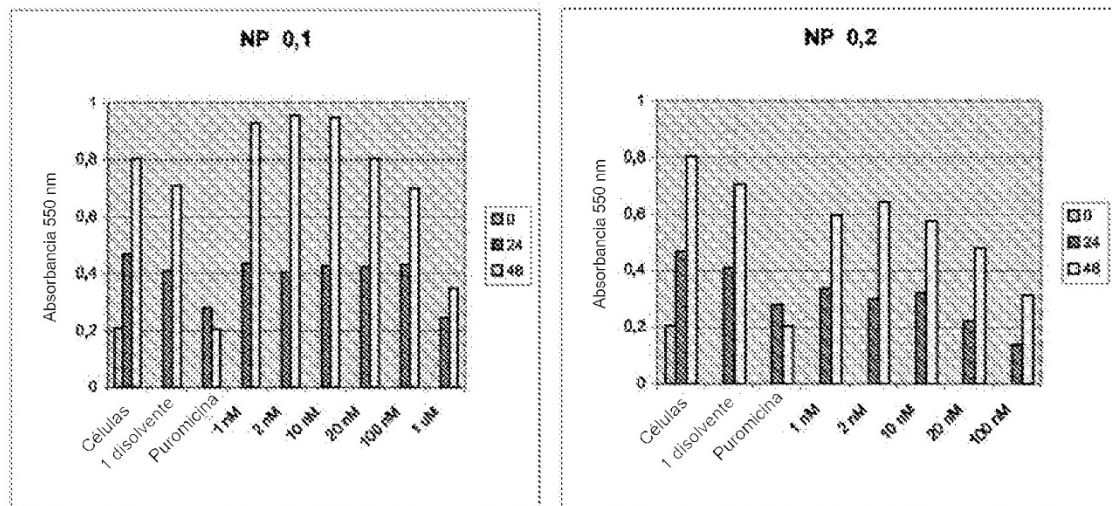


FIG 16

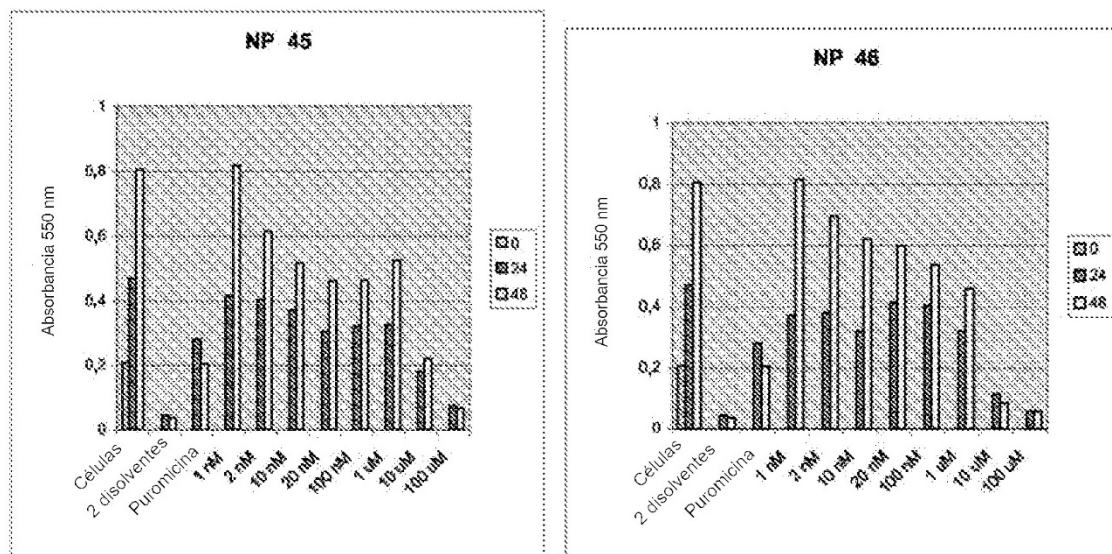


FIG 17

Fluorescencia

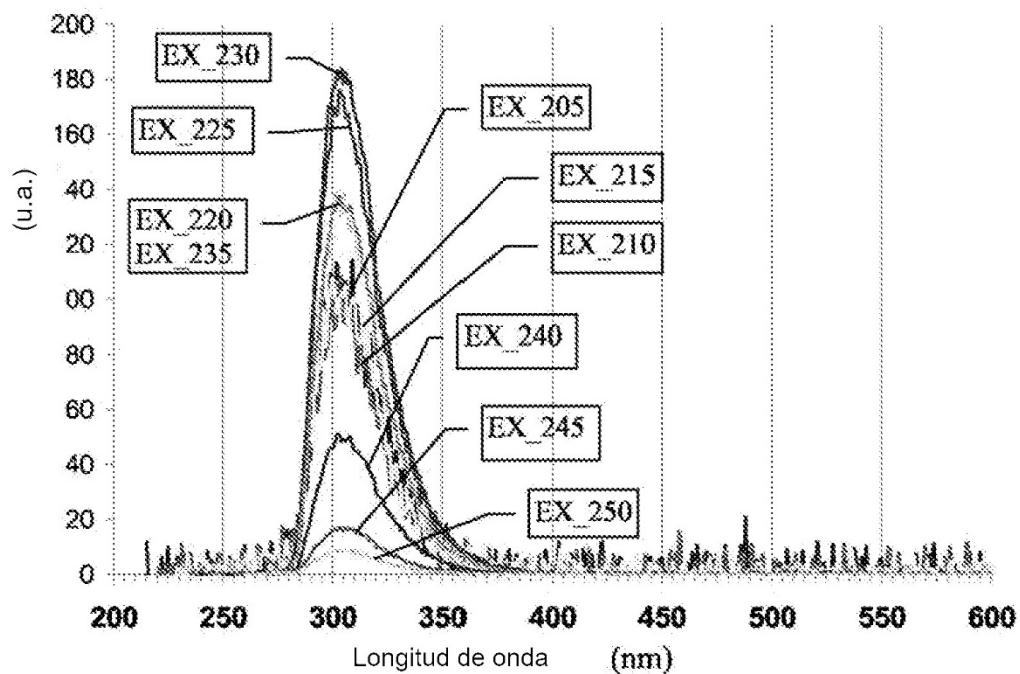


FIG 18

Intensidad

